DIE ALANIN - DEHYDROGENASE DER EUGLENA GRACILIS. BEDEUTUNG FÜR DEN INTERMEDIÄREN STOFFWECHSEL, REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN.

Gerhard Friedrich

1969

Aus dem Physiologisch - Chemischen Institut der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. phil. Dr. med. R. Ammon

DIE ALANIN - DEHYDROGENASE DER EUGLENA GRACILIS. BEDEUTUNG FÜR DEN INTERMEDIÄREN STOFFWECHSEL, REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1969

vorgelegt von

Gerhard Friedrich

geb. am 17.3.1934

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H. Witter

Referenten: Prof. Dr. Dr. R. Ammon, Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 6. 2. 1969 abgelegt.

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

ABKÜRZUNGEN

DNP	Dinitrophenol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Gl-DH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MJE	Monojodessigsäure
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
NADHoxydase	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-oxydase
PCMBA	Parachlormercuribenzoat
PP	Pyrophosphat
Tris	Tris (Hydroxymethyl) -aminomethan
PyP	Pyridoxalphosphat

INHALT

Abkürzungen

A. Einleitung . . . . . Seite 6

B. Material und Methoden . . . . . Seite 8

1. Die Euglena und ihre Züchtung . . . . . Seite 8

2. Messung der Enzymaktivität . . . . . Seite 9

3. Analytische Methoden . . . . . Seite 10

4. Präparate . . . . . Seite 12

C. Ergebnisse . . . . . Seite 13

Regulation des Stoffwechsels:

1. Influx des Alanins in die Euglena-Zelle. . Seite 13

a. p_H-Wert-Abhängigkeit . . . . . Seite 14

b. Aktivierung und Hemmung . . . . . Seite 15

2. Partielle Reinigung der Alanin-Dehydrogenase . . 17

a. Bereitung des Rohextraktes . . . . . Seite 17

b. Erste Ammonsulfatfraktionierung . . . Seite 17

c. Zweite Ammonsulfatfraktionierung . . . Seite 18

d. Biogeladsorption und -elution . . . . . Seite 18

e. Dritte Ammonsulfatfraktionierung . . . Seite 18

f. Temperatureinfluß . . . . . Seite 21

g. Reinheit des Enzyms . . . . . Seite 21

3. Eigenschaften:

Kinetische Untersuchungen der Aktivität der Alanin-Dehydrogenase . . . . . Seite 21

a. Abhängigkeit der Alanin-Dehydrogenase von der Fermentkonzentration . . Seite 21

b. Kinetik der reduktiven Aminierung von Pyruvat durch Ammoniumionen . . . . . Seite 23

c. Kinetik der oxydativen Desaminierung von L-Alanin . . . . . Seite 31
d. Coenzym- und Substratspezifität . . . . Seite 31
e. Aktivierung und Hemmung der Alanin-Dehydrogenase . . . . . Seite 31
f. p_H-Wert-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit . . . . . Seite 33

D. Diskussion . . . . . Seite 35

E. Zusammenfassung . . . . . Seite 38

Literaturverzeichnis . . . . . Seite 39

A. Einleitung

Algen werden heute in steigendem Umfang zur Lösung verschiedener aktueller Probleme der allgemeinen Biologie benutzt. Sie sind im Meer und in Binnengewässern die bedeutendsten Primärproduzenten. Die Euglena gehört zu den Algen, die man in einer sehr heterogenen Gruppe von niederen Pflanzen zusammenfaßt. Sie haben eine lange erdgeschichtliche Vergangenheit. Einige Formen reichen möglichweise bis zur Entstehung zelliger, photosynthetisch aktiver Pflanzen zurück. Allgemein werden die Algen als die Pflanzengruppe betrachtet, von der die kompliziert gebauten Kryptogamen und schließlich auch die Spermatophyten abstammen. Zahlreiche sogenannte einfache Einzeller sind in Wirklichkeit viel komplizierter gebaut als die Zellen irgendeiner höheren Pflanze, da ihre Zellwand mehr Organellen umschließt. In Hinblick auf Beweglichkeit und Gestalt der Euglena sind gleitende Übergänge zu den Protozoen festzustellen. Die Euglena besitzt wie alle Algen z. B. Chlorophyll a, und ihr photosynthetisches System arbeitet mit diesem Pigment. Der Bedarf an Grundnährstoffen und die Endprodukte der Photosynthese, Kohlenhydrate und Proteine, sind denen der höheren Pflanzen ganz ähnlich. Die Funktion der Zellwand übernimmt bei ihr die peripher verfestigte Schicht der Protoplasten (Periplast oder Pellicula). Trotz der cytoplasmatischen Natur des Periplasten weist die Euglena komplizierte Streifenstrukturen auf, die im Elektronenmikroskop als Serie von halbstarren Ringen erscheint, welche mit Streifen schmiegsamerer Substanz wechsellagern. (1)

Als einzellige Flagellaten besitzen Euglenen neben einer Langgeißel eine deutliche Kurzgeißel, beide entspringen in einer Einbuchtung der Zelle. Auch ein Augenfleck und kontraktile Vakuolen sind vorhanden, die Chromatophoren sind bandförmig. Neben den Carotinoiden enthalten die Granula des Augenflecks noch ein besonderes Pigment, das Astaxanthin, das auch in verschiedenen Tieren vor-

kommt. Die Euglena besitzt charakteristische pflanzliche und auch tierische Pigmente. (2)

Da bei Euglenen eine Differenzierung des Zellgefüges in Organe der Stoffaufnahme und in solche der Photosynthese nicht vorkommt, kann man sie als ideales Versuchsobjekt für Stoffwechselstudien benutzen. Komplikationen des Stofftransportes, wie sie in pflanzlichen und animalischen Organismen auftreten, entfallen hierbei. Da man die Euglena vom Kulturmedium gleichmäßig umgeben züchtet, beschränkt sich die Kontrolle des Stoffwechsels auf das flüssige Medium, welches auch die Umweltfaktoren stellt.

Die Euglena kann energiereiche organische Verbindungen aufnehmen und verwerten, man kann sie als fakultativ chemo-organotroph bezeichnen. Sie stellt als einzelliger Organismus eine unabhängige Einheit dar, trotzdem wird ihre Funktion von verschiedenen äußeren Faktoren bestimmt. Der Stoffwechsel wird durch Membranphänomene reguliert, also durch Eigenschaften der biologischen Membran, welche bestimmte Partikel durchläßt und andere zurückhält.

Bei der Euglena gracilis konnte die Existenz eines Enzyms gezeigt werden, das die oxydative Desaminierung des Alanins und reduktive Aminierung von Pyruvat entsprechend folgender Gleichung katalysiert:

$$CH_3\text{-}CH(NH_3^+)\text{-}COO^- + NAD^+ + H_2O \rightleftharpoons H_3C\text{-}CO\text{-}COO^- + NADH + H^+ + NH_4^+$$

Diese Reaktion besitzt in zweifacher Hinsicht Bedeutung: Sie realisiert den Weg einer Oxydation des Alanins, und sie ermöglicht auch im Prinzip den Eintritt des Ammoniums in die Synthese der Aminosäure. Die letzte Reaktion wurde für die Glutaminsäure-Dehydrogenase bewiesen. (3) Die Analogie zwischen der letzten Reaktion und der oxydativen Desaminierung führte dazu, dieses Enzym "Alanin-Dehydrogenase" zu nennen. Seine physiologische Rolle und seine Verteilung bei anderen Organismen ist sehr aktuell. Wir haben eine Hypothese aufgestellt, nach der die Glutaminsäure auf dem Wege einer Transaminierung in Alanin überführt wird, das dann mit Hilfe der Alanin-Dehydrogenase dehydriert wird.

B. Material und Methoden.

1. Die Euglena und ihre Züchtung

Die Züchtung der Euglena gracilis (Stamm Z 1224-5/25), die wir Herrn Prof. E.G. Pringsheim in Göttingen verdanken, erfolgte in zylindrischen, 3 cm lichten Glasrohren von 300 ml Inhalt, die sich am unteren Ende zu einer 2 mm weiten Düse konisch verengten. Die Rohre wurden mit einem Gemisch aus Luft und 5 % CO_2 durchströmt. Dadurch wurde eine ständige Durchmischung der Algensuspension erreicht und ein Absetzen der Zellen verhindert. Wir züchteten die Kulturen in einem temperierten Wasserbad von $25^{o} \pm 0,1$ C. und bestrahlten sie in einem abgeschlossenen Raum Tag und Nacht mit fünf 40 Watt starken Leuchtstofflampen (TL 32 und TL 55 der Firma Philips). Der Abstand der Lampen betrug ca. 30 cm.

Zur Sterilisation der Nährlösungen benutzten wir einen Autoklaven (2 Atü, 138^{o} C, 20 Minuten) oder einen Ultrafilter (Firma Seitz). Die Salzlösung enthielt in 1 Liter an Mineralien:
500 mg KH_2PO_4; 500 mg $MgSO_4$; 7 H_20; 100 mg $CaC0_3$ 60 mg $MnS0_4 \cdot H_20$; 110 mg $ZnS0_4 \cdot 7 H_20$; 17 mg $FeS0_4 \cdot (NH_4)_2 S0_4 \cdot 6 H_20$; 3 mg $CoS0_4 \cdot 7 H_20$; 10 mg $(NH_4)_6 Mo_7 0_{24} \cdot 4 H_20$; 0,4 mg $CuS0_4 \cdot 5 H_20$; 0,3 mg H_3B0_3.

Vitamine: 1 mg Thiamin-hydrochlorid und 1 µg Cyanocobalamin.
Komplexbildner 50 mg EDTA.
"Schrägagar" in Reagenzgläsern (1-2%ige Konzentration) verwendeten wir bei der Erhaltung der Stammkultur. Hier wächst die Euglena langsam, sodaß eine Überimpfung nur alle vier bis sechs Wochen notwendig ist. (Die Nährlösung enthält 0,2%ige Peptone, 0,1%igen Fleischextrakt, 0,1%igen Hefeextrakt und 0,1%iges Acetat).

Je nach Versuchsbedingung wurden die entsprechenden organischen Substrate hinzugefügt. Erreichten die Kulturen eine Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, wurden die Rohre durch Zentrifugieren abgeerntet.

Die Kulturen, die zu Enzymaktivitäts- und Substratbestimmungen verwandt wurden, züchteten wir in einem Medium, das neben der Salzlösung 5 g L-Glutaminsäure/Liter (bzw. 5 g Alanin/Liter) enthielt, und wir brachten die Lösung auf einen p_H - Wert von 3,5.

Herstellung von zellfreien Enzymextrakten

Die abgeernteten Zellen wurden dreimal mit Triäthanolamin-Puffer p_H 7,6 (0-4° C) gewaschen. Der Aufschluß der Algen erfolgte in dichter Suspension, und zwar etwa 30 % Zellen mit Ultraschall (2 Minuten lang bei 10 kc mit dem Branson Ultraschallgerät). Die Zelldichte wurde mit Hämatokritröhrchen bestimmt. Die Zellsuspension wurde immer auf ungefähr den gleichen Hämatokritwert eingestellt. Als Suspensionsmedium diente uns je nach Enzymbestimmung:
0,1 M Triäthanolamin-, 0,1 M Phosphat- oder 0,1 M Tris-Puffer.

Es wurde darauf geachtet, daß die Temperatur während der Beschallung in der Suspension nicht über 10° C anstieg. Die zertrümmerte Zellsuspension wurde 30 Min. bei 0 - 4° C stehengelassen.

Durch Zentrifugation der Homogenate bei 20 000 g/30 Min. und anschließend bei 105 000 g/2 Stunden erhielten wir partikelfreie Extrakte, die zur Enzymaktivitäts- und Eiweißbestimmung verwandt wurden. Zur Kontrolle schlossen wir die Zellen mit dem Vibrationshomogenisator der Firma Bühler (Glasperlendurchmesser 0,35 mm) und durch Zerreiben im Mörser auf. Die Ergebnisse der drei Aufschlußmethoden stimmen überein.

2. Messung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität der Alanin-Dehydrogenase wurde nach der klassischen Methode von Goldman (4) durch den Wechsel der NADH-Konzentration gemessen, entweder durch die Oxydation des NADH oder durch die Reduktion des NAD. Die Aktivität wurde gewöhnlich gemessen, indem man die reduktive Aminierung des Pyru-

vates durch NADH und NH_3 verfolgte. Unter diesen Versuchsbedingungen verlief die Reaktion ca. 10mal schneller in der ersten Richtung, (reduktive Aminierung) als in der umgekehrten Richtung (oxydative Desaminierung).

Der Reaktionsansatz für die reduktive Aminierung enthielt: 150 uMol Tris-Puffer p_H 8,6; 0,24 µ Mol NADH; 9 µ Mol Na-Pyruvat; 2,7 mg Rinderserum - Albumin; 150 µg Alanin-Dehydrogenase. Das Gesamtvolumen betrug 3,0 ml, die Schichtdecke 1 cm. Die Reaktionstemperatur lag bei 20° C. Gemessen wurde die Rate der NADH-Oxydation durch Verfolgung des Wechsels der optischen Dichte bei 366 um, die Werte wurden alle 15 Minuten abgelesen. Die Reaktion wurde 2 - 3 Minuten beobachtet. Substratfreie Kontrollen wurden durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde definiert als u Mol pro mg Protein. Die Proteine wurden nach der Biuret-Methode bestimmt. (5) Damit sich das Eiweißsediment besser löste, beschallten wir es mit Ultraschall. Zur optischen Messung verwandten wir das Spektrophotometer der Firma Netheler und Hinz (Typ Eppendorf). Die p_H- Bestimmung nahmen wir mit dem p_H -Meter 300 der Firma Metrohm / Herisau - Schweiz vor.

Der Reaktionsansatz für die oxydative Desaminierung enthielt: Tris - Puffer p_H 9,5; 3 uMol NAD; 30 u Mol L - α- Alanin; 10 - 200 ug Alanin-Dehydrogenase. Das Gesamtvolumen betrug 3 ml. Die Reaktionstemperatur lag bei 20° C. Der molare Absorptions-Koeffizient von NAD war $3,3 \cdot 10^3$ l / Mol / cm.

3. Analytische Methoden.

Das Endprodukt der reduktiven Aminierung, das Alanin, wurde isoliert und papierchromatographisch analysiert. Nach einer Inkubationsperiode von 15 Minuten wurde das Enzym durch Zugabe von 0,5 ml Äthanol inaktiviert. Das Reaktionsvolumen wurde unter vermindertem Druck eingeengt, bis es trocken war, der Rückstand

wurde zweimal mit je 0,5 ml Äthanol extrahiert. Die Alkoholextrakte wurden vereinigt und bis auf 0,2 ml eingeengt. Das Konzentrat wurde auf Chromatographiepapier aufgetragen. Die Chromatographie wurde aufsteigend durchgeführt, in zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen. 1. Lösungsmittel : Isopropanol- Ameisensäure - Wasser, 75 : 13 : 12. 2. Lösungsmittel: mit Phenol gesättigtes Wasser. Die Aminosäureflecken wurden mit Ninhydrin bei 110° C 15 Minuten getrocknet. Unter diesen Bedingungen war der durch autentisches Alanin hervorgerufene Fleck (Rf-Wert) identisch mit dem unbekannten Fleck.

- L - α- ALANIN (Bestimmung nach G. Pfleiderer)

Prinzip: - α- L - Alanin wird durch Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und α-Ketoglutarat in Pyruvat übergeführt: (6)

1. α-Ketoglutarat + -α- L-Alanin $\overset{GPT}{\rightleftarrows}$ L-Glutamat + Pyruvat

Lactat-Dehydrogenase (LDH) hydriert Pyruvat in Gegenwart von reduziertem Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu Milchsäure.

2. Pyruvat + NADH + H^+ $\overset{LDH}{\rightleftarrows}$ L-Lactat + NAD^+

Die Abnahme von NADH wird bei 366 µm gemessen. Die Indikatorreaktion verläuft vollständig von links nach rechts, da die Gleichgewichtskonstante bei p_H 7,0 und 25° C 7.10^2 1/Mol beträgt. Eine Endwertbestimmung ist jedoch nicht möglich, weil die Indikatorkonstante des Enzyms für Alanin zu groß ist. Unter Überschuß an beiden Enzymen und NADH ist die Geschwindigkeit der gekoppelten Reaktion für begrenzte Alaninkonzentrationen der eingesetzten Alaninmenge streng proportional. Durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeit lassen sich anhand einer mit bekannter Alaninkonzentration aufgestellten Eichkurve Alanin-Bestimmungen ausführen. Da es in diesen Versuchen nicht auf absolute Werte ankam, haben wir nur die Extinktionen gemessen.

Die experimentelle Reaktionslösung enthält 20 µMol α-Ketoglutarat; 0,1 µMol NADH; 10 µg Lactat-Dehydrogenase; 400 µg Glutamat-Pyruvat-Transaminose; Gesamtvolumen 3 ml; Schichtdicke 1 cm; Wellenlänge 366 nm; 0,5 ml zu testende Lösung.

4. Präparate

Euglena gracilis, Stamm 1224 5/25, von Prof. E.G. Pringsheim, Göttingen, Institut für Algensammlung

GPT, L-Ketoglutarat, LDH, NAD, NADH, NADP, NADPH, Na-Pyruvat und Oxalacetat von Firma Boehringer, Mannheim.

DL-Alanin, L-Alanin, Phenylalanin und Serin von Firma Fluka, Buchs / St. Gallen, Schweiz.

EDTA und Pyridoxalphosphat von Firma Merck, Darmstadt.

PCMBA von Firma Dr. Schuckardt, München

C. Ergebnisse

1. Regulation des Stoffwechsels: Influx des Alanins in die Zelle.

Der intermediäre Stoffwechsel spielt sich vorwiegend innerhalb der Zelle ab und kann als offenes System von vernetzten enzymatischen Prozessen betrachtet werden. Er wird aber durch den Heran-transport der exogenen Substrate des Stoffwechsels beeinflußt: Die dynamischen Verhältnisse werden durch die Flußgleichgewichte reguliert. Wie rasch ein Substrat umgesetzt wird, ist ein Transportproblem und ein Problem des enzymatischen Umsatzes am Zellort selbst. Biologisch wichtig ist die richtige Einstellung des Ausmaßes der Pumpwirkung. Sie wird wie in jedem Regelkreis von der Regelgröße (also von dem zu transportierenden Stoff) abhängen.

Die Möglichkeiten, über die dieser Regelkreis arbeiten kann, müssen der in seiner Größe veränderliche Widerstand der Membran für die entsprechende Substanz und auch die Aktivitäten der am Transport beteiligten Enzyme sein.

Der aktive Transport ist ein biochemischer Vorgang, der als physikalisch- chemische Größe, nämlich als Konzentrationsänderung, meßbar wird. Eine Wechselwirkung zwischen der statischen Feinstruktur der Zelle und den sich an ihr abspielenden chemischen Vorgängen äußert sich in einer Konzentrationsänderung gegenüber der passiven Verteilung.

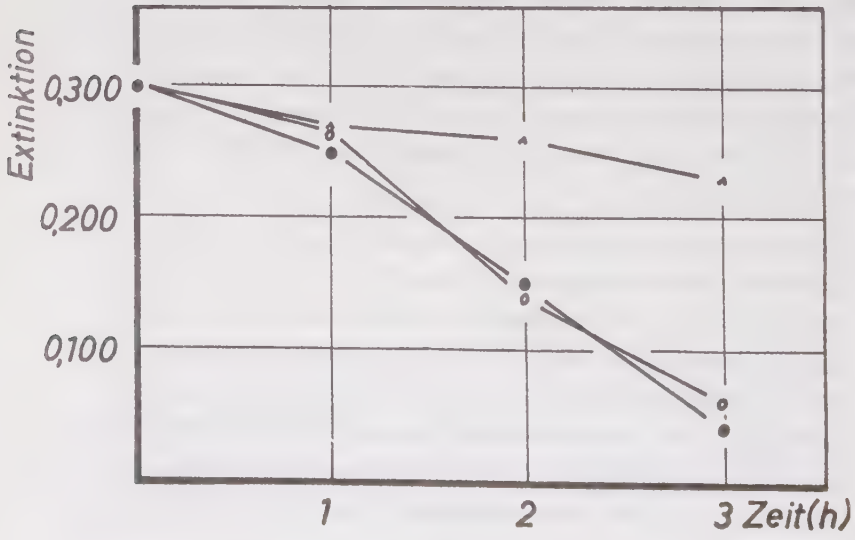
Der aktive Transport ist ein endergonischer (d.h. Energie verbrauchender) Konzentrierungsvorgang. Dabei findet die Konzentrierung nicht durch Neubildung eines Stoffes, sondern durch seine Beförderung von einer Stelle zu einer anderen statt. Dieser Vorgang ist gerichtet und energieabhängig, deshalb als Teilprozeß unfreiwillig. Das Wesen dieses Prozesses besteht nun darin, daß er einen zweiten Stoffdurchtritt in Gang setzte, der freiwillig in einer Richtung abläuft, und der aus dem energieabhängigen ersten Prozeß seine Energie bezieht.

Es ist bekannt, daß der selektive Stofftransport durch eine lebende Membran, im Gegensatz zur freien Diffusion, einige Merkmale mit enzymatischen Reaktionen gemeinsam hat. Dazu gehört neben einer p_H - Abhängigkeit eine Hemmbarkeit durch Stoffwechselgifte.

a) P_H - Wert-Abhängigkeit

Tab. 1 u. Abb. 1 : Abnahme der Alaninkonzentration des Kulturmediums bei verschiedenen p_H-Werten, die Konzentrationen sind ausgedrückt durch die Extinktionswerte, welche Mittelwerte aus je drei Parallelansätzen sind.

Inkubationsdauer	p_H der Zellsuspension		
	p_H 3,5	p_H 4,5	p_H 6,5
0	0,300	0,300	0,295
1 Std.	0,250	0,265	0,270
2 Std.	0,150	0,140	0,260
3 Std.	0,040	0,060	0,230



Zeichenerklärung: ● p_H 3,5; o p_H 4,5; ▲ p_H 6,5

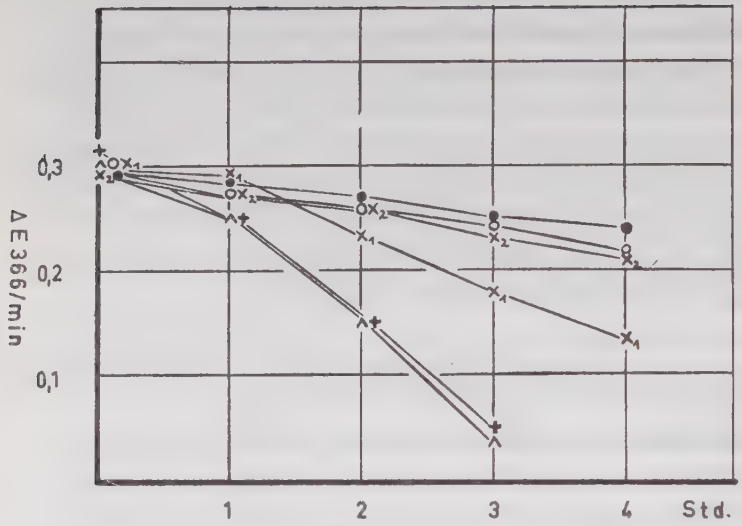
Das Optimum des Alanin$_{in}$flux liegt nicht in der Nähe des p_H-Wertes, den man für neutrale Aminosäure annehmen sollte, sondern entspricht dem des Glutamatinflux. Sowohl die kompetitive Hemmung wie auch die p_H-Abhängigkeitsversuche lassen also auf einen gemeinsamen Aminosäuretransportmechanismus schließen. Da die Dissoziationskonstanten der Glutaminsäure und des α-Alanin verschieden sind, aber eine Übereinstimmung in der p_H-Abhängigkeit des Influx vorliegt, dürfte der Dissoziationszustand nicht direkt als Akzeptor für die Aminosäure fungieren. Eine Erklärung liefert vielleicht eine p_H-Abhängigkeit des oberflächlichen ATP-ase-Systems.

b. Aktivierung und Hemmung des Alanininflux.

Über die energetische Koppelung zwischen Transport und energieliefernder Reaktion ist noch nichts bekannt. Wahrscheinlich sind nur die Reaktionen energetisch gekoppelt, die der Rückführung und der Reaktivierung des Überträgers dienen. Der aktive Transport wird durch die Monojodessigsäure gehemmt, dies dürfte in der Zerstörung des intracellulären ATP begründet sein. Aus der Hemmbarkeit des Influx durch 2,4 Dimitrophenol kann auf die wahrscheinliche Beteiligung energiereicher Phosphate geschlossen werden.

Tab. 2 und Abb. 2 Abhängigkeit des Glutamatinflux von den Stoffwechselhemmern Dintrophenol und Monojodacetat, vom Pyridoxalphosphat und von Sulfationen.

Inkubationsdauer	ΔE NADH/min. 0	1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.
Kontrolle	0,300	0,250	0,150	0,040	-
DNP	0,290	0,280	0,260	0,250	0,230
MJE	0,300	0,270	0,250	0,245	0,215
Pyp	0,305	0,250	0,150	0,045	-
SO_4(1)	0,300	0,290	0,230	0,180	0,140
SO_4(2)	0,290	0,270	0,250	0,230	0,210



Zeichenerklärung: • DNP, o MJE, + PP, ^Kontrolle
$X_1SO_4^{--}$ $X_2SO_4^{--}$

Eine Möglichkeit, daß die Aminosäure während des Transportes an der Aminogruppe aktiviert wird, wurde bereits von Christensen (7) im Zusammenhang mit der von ihm entdeckten Wirkung des Pyridoxals auf den Aminosäuretransport diskutiert. Das Pyridoxal sollte als Kofaktor des Carriers fungieren und dabei mit der Aminogruppe vorübergehend eine Schiffsche Base bilden. Gegen die Annahme einer Schiffschen Base sprechen unsere Versuche mit Pyridoxal bzw. Pyridoxalphosphat. (siehe Abb. 2 und Tab. 2) Wenn das Pyridoxalphosphat direkt am Transport beteiligt wäre, müßte sein Effekt mit einer Steigerung des Influx von Glutaminsäure verbunden sein. Es zeigte sich, daß Pyridoxalphosphat keinen Einfluß auf das Transportgeschehen ausübt. (siehe Abb. 2 und Tab. 2).

2. Partielle Reinigung der Alanin-Dehydrogenase.

a. Bereitung des Rohextraktes.

Die in der logarithmischen Phase wachsenden Euglena-Zellen wurden dreimal mit Triäthanolamin-Puffer p_H 7,5 gewaschen und dann mit Ultraschall behandelt. Die Zellextrakte wurden bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand des Rohextraktes wurde ohne Aktivitätsverlust weiter geklärt, und zwar durch eine zwei Stunden dauernde Zentrifugation bei 0° bis 4° C und bei 105 000 g, in einer Spinco-Präparations-Zentrifuge. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand durch die Zugabe von Ammonsulfat fraktioniert.

b. Erste Ammonsulfatfraktionierung.

Alle Operationen erfolgten bei einer Temparatur, die zwischen 0° und 4° C lag. Nach dem Schritt, der den Enzymextrakt durch Zentrifugation von kropuskulären Bestandteilen befreite, wurde nach Bücher und Mitarbeiter (8) das aktive Protein mit Ammonsulfat ausgefällt. Das Salz fügten wir stufenweise dem Reaktionsansatz bei. Zwischen 18 und 21 Gew. - % Ammonsulfat fällt dabei das Fermenteiweiß aus.
Praktisch gingen wir bei der Ammonsulfatfraktionierung so vor, daß im Verlauf des ersten Tages die Lösung schrittweise zunächst auf 16, dann auf 18 und schließlich auf 22 Gew. - % Ammonsulfat gebracht wurde; denn wie die stufenweise Fraktionierung (dargestellt in Abb. 3) zeigt, ist die Hauptmenge des Enzyms in den Fraktionen 19, 20, 22 Gew. - % enthalten.
Das ausgefällte Eiweiß wurde jeweils nach einigen Stunden abzentrifugiert (20 000 xg, 0° C, 15 min), während das Sediment (22 Gew. -%), welches die Hauptmenge des Enzyms enthielt, erst am Morgen des zweiten Tages gewonnen wurde. Der Überstand wurde verworfen.

Das Sediment wurde anschließend in 20 ml 0,05 µ Triäthanolamin-Puffer p_H 7,6 bei 0° C gelöst und die Lösung erneut zentrifugiert

(20 000 x g, 0° C, 15 min). Der klare Überstand wurde schließlich etwa 12 Stunden lang gegen 0,05 μ Triäthanolamin-Puffer p_H 7,6 bei 0° C dialysiert.

c. Zweite Ammonsulfatfraktionierung.

An diese erste fraktionierte Ammonsulfatfällung schloß sich nach einer Dialyse eine zweite an, die auf die gleiche Weise erfolgte wie die erste.

d. Biogel-Adsorption und-Elution.

Die sich anschließende Anwendung der Biogel-Adsorption setzte voraus, daß Elektrolyten möglichst weitgehend aus der Proteinlösung entfernt werden. Deshalb wurde die Lösung 8 Stunden lang gegen 2 x 1 Liter Triäthanolamin-Puffer p_H 7,6 bei 0° C dialysiert. Danach wurde das Eiweiß an einer Säule durch Gradienten-Elution mit Kochsalz aufgetrennt. Die Durchflußgeschwindigkeit des Puffers betrug etwa 0,6 ml/Min. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler (Radirac der Firma LKB) in 1,5 ml- Fraktionen unterteilt.

e. Dritte Ammonsulfatfraktionierung.

Die aktivsten Fraktionen des Eluats der Biogeladsorption wurden vereinigt und unter ständigem "Plümpern" (8) mit Ammonsulfat bis zu einer Sättigung von 18 Gew.-% versetzt. Das geringe Sediment war inaktiv und wurde verworfen. Zum Überstand wurde weiter Ammonsulfat sehr langsam und unter ständigem Rühren zugegeben, bis eine Konzentration von 21 Gew.-% erreicht war.

Während der Fällung trat ein schwacher Seidenglanz auf, mit weiterer Zugabe von Ammonsulfat fiel das Protein amorph aus. Es gelang aber nicht, im mikroskopischen Bild Kristalle des Enzyms darzustellen. - Alle Reinigungsschritte der beschriebenen Enzympräparation sind in einem typischen Beispiel mit quantitativen Angaben in Tab. 3 zusammengestellt.

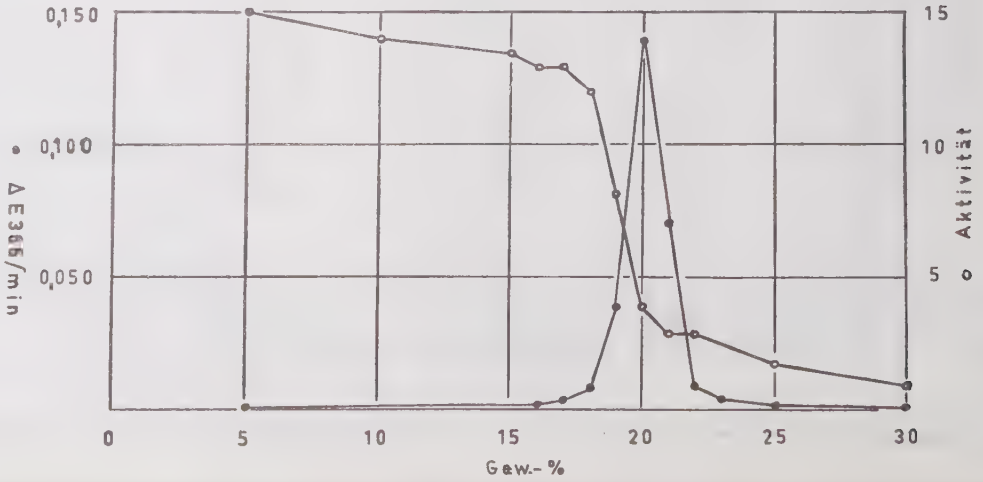
Tab. 3 Gesamtübersicht über einen Präparationsvorgang der Alanin-Dehydrogenase aus dem Zellextrakt der Euglena gracilis.

	Fraktion	Gesamtaktivität U/min.	Gesamtprotein mg	spezif. Aktivität µMol/ mg Protein	Anreicherung
I	Rohextrakt (40 000 xg /1 Std.)	3 100	8 700	0, 35	
II	Überstand des Zentrifugats (105 000 xg/ 2 Stdn)	2 900	5200	0, 56	x 1, 6
III	Dialysat nach der 1. Ammoniumsulfat-fraktionierung	1 900	900	2, 1	x 6
IV	Dialysat nach der 2. Ammoniumsulfat-fraktionierung	1 400	370	3, 7	x 10
V	Biogelsäulen eluat	1 050	120	11, 0	x 30
VI	3. Ammoniumsulfat-fraktionierung (Ammoniumsulfat-Suspension)	900	70	12, 9	x 36

Tab. 4 Wiedergabe einer fraktionierten Fällung des Proteins mit Ammoniumsulfat im Überstand des Zellextraktes (105 000 xg/ 2 Stdn. ausgedrückt durch die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase.

Gew. -% Ammoniumsulfat	5	15	16	18	19	20	21	22	25	30
Aktivität im Überstand der Ammoniumsulfatfällung o	0,150	0,135	0,130	0,120	0,080	0,040	0,035	0,030	0,020	0,010
Aktivität des Ammonium-sulfat-Sedimentes •			0,1	1,0	4,0	14,0	7,0	1,0	0,1	0,05

Abb. 3 (zu Tab. 4)



f. Temperatureinfluß.

Die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität zeigt, daß das Enzym ein Protein ist. Ein Erhitzen des Enzyms, eine Minute lang bei 60° C zerstört 80 % der Aktivität, daraus läßt sich die Wirkung der Temperatur auf die Denaturierung des Enzyms erkennen.

g. Reinheit des Enzyms.

Aktivitäten der GOT, der GPT, der GlDH, der MDH, der LDH und der NADHoxydase waren in der Fraktion 5 der Enzympräparation nicht mehr nachweisbar.

3. Eigenschaften: Kinetische Untersuchungen der Aktivität der Alanin-Dehydrogenase.

a) Abhängigkeit der Alanin-Dehydrogenase von der Fermentkonzentration.

Die Zelle kann ihren eigenen Stoffwechselfluß dadurch kontrollieren, daß sie den Nachschub von geringen Mengen aktiver Enzyme reguliert. Die Biokatalyse soll also nicht nur chemische Reaktionen beschleunigen, sondern vielleicht sogar hauptsächlich diese regulieren. Um die regulatorischen Fähigkeiten der Enzyme richtig verstehen zu können, müssen wir zuerst ihre allgemeinen Eigenschaften untersuchen.

Die Enzyme unterscheiden sich von den übrigen Eiweißen durch ihre katalytischen Eigenschaften. Bei der Enzymmessung bedient man sich der Aktivitätsmessung. Dabei wirken eine limitierende Zahl von Enzymmolekülen auf eine im Überschuß vorliegende Zahl von Substrat molekülen ein, unter definierten Bedingungen und während einer bestimmten Zeit.
Als Maß für die Aktivität doent der Substrat-Umsatz pro Zeit-Einheit, wobei entweder die Abnahme des Substrates ($-\frac{ds}{dt}$) oder die

Zunahme des Produktes ($+\frac{dP}{dt}$) gemessen werden. Bei der Bestimmung einer Enzymaktivität wird angenommen, daß Enzymaktivität und Enzymkonzentration direkt proportional sind: $-\frac{dS}{dt}=(E)k$. Diese Voraussetzung zeigen Tabelle 5 und Abbildung 4 .

Die Aktivität wird bestimmt, indem (ausgehend vom Zeitpunkt Null) alle 15 Sekunden Werte bestimmt werden, die sich graphisch in einer Kurve darstellen lassen. An diese Kurve nun wird eine Tangente gelegt, und die Steigerung dieser Geraden bezeichnet man als die Anfangsrate der Reaktion, welche von der Enzymkonzentration abhängt. Teilt man den Wert der Anfangsrate durch den der Gesamtmenge des anwesenden Proteins, so erhält man ein Maß für die Reinheit eines Enzympräparates, die sogenannte spezifische Aktivität.
Zunächst untersuchten wir die Abhängigkeit von der eingesetzten Fermentkonzentration.

Tab. 5 Abhängigkeit der Aktivität von der Fermentkonzentration

	ΔE NADH		
mg Protein	0,050	0,100	0,150
Min.			
1.	0,045	0,095	0,140
2.	0,092	0,180	0,275
3.	0,135	0,280	0,420

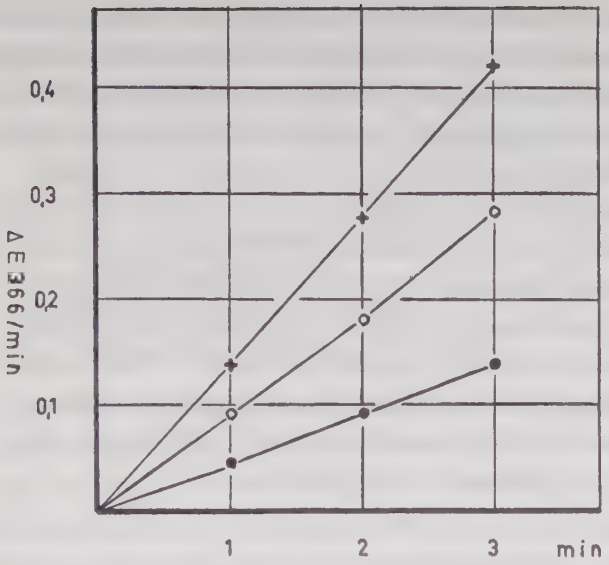


Abb. Einfluß von Zeit und Fermentkonzentration auf die enzymatische Aminierung von Pyruvat.
Zeichenerklärung: ● µg, x µg, ○ µg, ✚ µg Protein.

b) Kinetik der reduktiven Aminierung von Pyruvat durch Ammoniumionen.

Die Geschwindigkeit einer Reaktion ist festgelegt durch die Menge der aktiven Enzymmoleküle und durch die Kinetik der Reaktion. Diese Menge wird ihrerseits direkt beeinflußt durch den enzymatischen Synthesemechanismus der Zelle und durch DNS, RNS, Ribosomen, indirekt beeinflußt durch die Konzentration der Substrate und Produkte der jeweiligen enzymatischen Reaktionen. Die Kinetik steht unter dem Einfluß der im Reaktionsmilieu vorherrschenden Verhältnisse: der Substratkonzentration, dem Vorhandensein oder Fehlen von Cofaktoren, Aktivatoren, Inhibitoren, des p_H - Wertes usw.

Die Substrate und die Produkte einer enzymatischen Reaktion haben großen Einfluß auf die betreffende Reaktionsrate: Nimmt die Substratkonzentration zu, so steigt auch die Enzymaktivität. Ist die Reaktion sowohl theoretisch als auch praktisch reversibel, so spielt das Massenwirkungsgesetzt eine Rolle, nach welchem eine Erhöhung der Konzentration des Produktes die Tendenz hat, auf die Reaktion verlangsamend zu wirken, um möglichst ein Gleichgewicht herzustellen. In vielen Fällen hemmt das Reaktionsprodukt den Ablauf der Reaktion, indem es mit dem Substrat um die aktive Oberfläche des Enzyms konkurriert. Das Ausmaß der Hemmung hängt von den relativen Konzentrationen von Substrat und Produkt ab, außerdem von deren relativer Affinität zum Enzym. Eine Anhäufung des Reaktionsproduktes verlangsamt dessen Bildungsrate.

Die meisten Enzyme scheinen Teil einer linearen Reaktionsfolge oder Sequenzen von Reaktionen zu sein, d.h. das Produkt der einen Reaktion wird zum Substrat des nächstfolgenden Enzyms in der Serie.
Die reduktive Aminierungsreaktion liefert (ausgehend vom Pyruvat und NH_3) Alanin. Wenn die Anfangsrate der Reaktion als Funktion der Substrat - Konzentration untersucht wird, betrachtet man die üblichen Michaelis - Menton - Beziehung.

Mißt man die Aktivität der Alanin-Dehydrogenase, welche die Reaktion in der Richtung der reduktiven Aminierung katalysiert, bei verschiedenen Pyruvat- und Amoniumkonzentrationen, und trägt man die jeweiligen Reaktionsraten in Beziehung zur Substratkonzentration auf, so erhält man Kurven wie sie in Abb. 5 u. 6 dargestellt sind. Mit wachsender Substratkonzentration erreicht die Geschwindigkeit V einen Endwert V, bei dem die Enzymaktivität proportional der Enzymkonzentration ist.

Als Erklärung für diese Beziehung gilt die Substrat-Enzym-Verbindung. Aus rein qualitativen Erwägungen ergibt sich, daß die Proportionalität zwischen Enzymaktivität und Enzymkonzentration nur dann erreicht wird, wenn die Substratkonzentration so hoch

ist, daß die gesamte Enzymmenge am katalytischen Prozeß beteiligt ist. - Geht man von der Annahme aus, daß für die Bildung eines Enzym - Substrat - Komplexes das Massenwirkungsgesetz gilt, ergibt sich folgende Beziehung: $v = \frac{V \quad S}{Km + [S]}$

v = Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion

V = End- oder Maximalgeschwindigkeit bei unendlich hoher Substratkonzentration

[S] = Substratkonzentration in Mol/l

K_m = Michaeliskonstante pro Liter Lösung.

Wir prüften die Sättigungsverhältnisse der Alanin-Dehydrogenase mit Pyruvat, NH_4^+ und NADH. Wie die Abb. 5 b, 6 b, 7 b, zeigen, ergibt die graphische Darstellung der Michaeliskonstanten eine Hyperbel. Die Kurven in diesen Abbildungen zeigen, daß die Michaeliskonstante derjenigen Substratkonzentration entspricht, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. K_m ist zwar kein exakter Wert, aber ein immerhin grob angenähertes Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat.

Bei der experimentellen Bestimmung von K_m ist für die planimetrische Auswertung der Daten das Verfahren von Lineweaver und Burk (9) vorteilhaft. Dabei wird die vom Massenwirkungsgesetz hergeleitete Formel in eine Geradengleichung überführt.

Bei der graphischen Darstellung braucht man daher lediglich die reziproken Werte der Substratkonzentrationen auf der Abszisse, und die reziproken Werte der gemessenen Aktivitäten auf der Ordinate abzutragen. Der Abszissen - Wert des Schnittpunktes der beiden Geraden ist dann gleich $\frac{1}{K_m}$

Die Abb. 5 a, 6 a, 7 a geben die Auswertung der Sättigungskurven nach Lineweaver und Burk (9) wieder, aus ihnen lassen sich die Michaeliskonstanten ermitteln.

Tab. 6 und Abb. 5 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Pyruvat - Konzentration

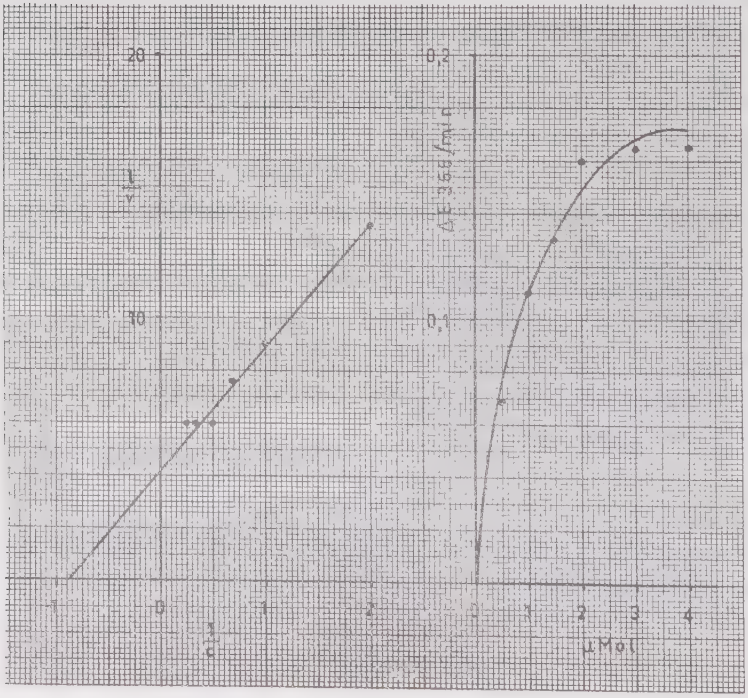
a) Ordinate : 1/v = 1/Extinktionsdifferenz x 100 pro min.
Abszisse : 1/c = 1/Mol Pyruvat pro Liter x 10^3

b) Ordinate : v Extinktionsdifferenz ΔE 366/min.
Abszisse : c µMol Pyruvat / ml

Pyruvat µMol	Δ E 366/min	$\frac{1}{c}$	$\frac{1}{v}$
0,5	0,074	2,0	13,8
1,0	0,110	1,0	9,0
1,5	0,130	0,66	7,7
2,0	0,160	0,5	6,0
3,0	0,165	0,32	6,0
4,0	0,165	0,25	6,0

Es ergibt sich die Michaelis-Konstante $K_m = 1,1 \cdot 10^3$ Mol/l

a Pyruvat b



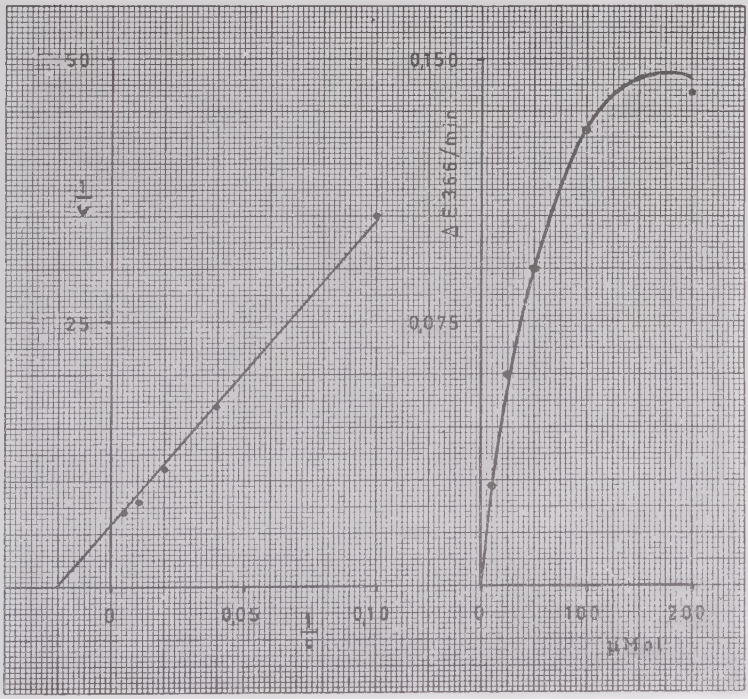
Tab. 7 und Abb. 6, Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NH_4^+-Konzentration

a) Ordinate : 1/v = 1/Extinktionsdifferenz x 100 pro min.
Abszisse : 1/c = 1/Mol NH_4^+ pro Liter x 10^3

b) Ordinate : v Extinktionsdifferenz ΔE 366 /min
Abszisse : c µMol NH_4^+/ml

NH_4^+ µMol	ΔE 366/min	$\frac{1}{c}$	$\frac{1}{v}$
10	0,028	0,100	35,0
25	0,060	0,040	17,0
50	0,090	0,020	11,0
100	0,130	0,010	7,7
200	0,140	0,005	7,2

Es ergibt sich die Michaelis-Konstante $K_m = 50 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.



Tab. 8 und Abb. 7, Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NADH - Konzentration

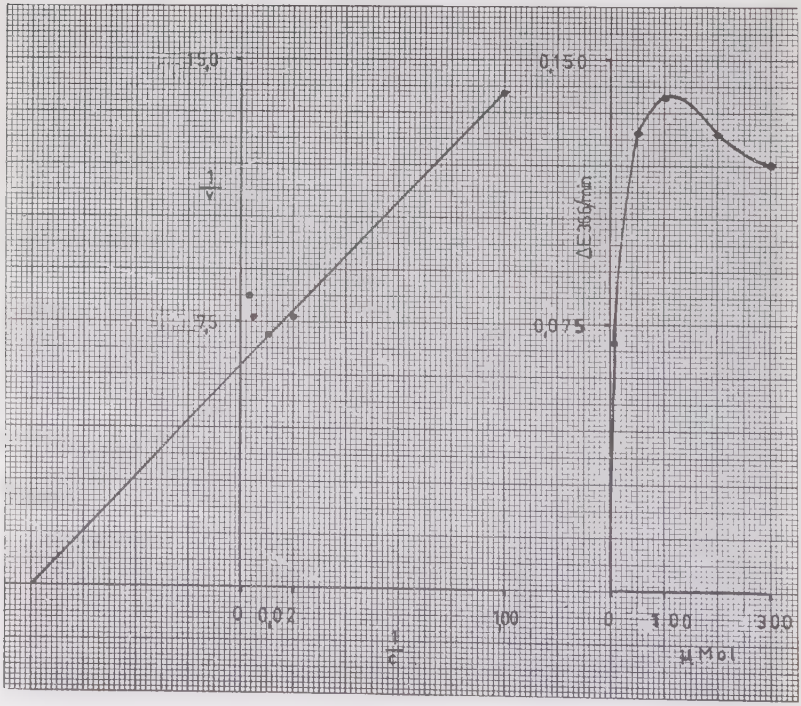
a) Ordinate : $1/v$ = 1/Extinktionsdifferenz x 1000 pro min.
Abszisse : $1/c$ = 1/Mol NADH pro Liter x 10^3

b) Ordinate : v Extinktionsdifferenz ΔE 366 /min
Abszisse : c µMol NADH / ml

NADH µMol	ΔE 366/min	$\frac{1}{c}$	$\frac{1}{v}$
10	0,07	0,1	14,2
50	0,13	0,02	7,7
100	0,14	0,01	7,1
200	0,13	0,005	7,7
300	0,12	0,0033	8,3

Es ergibt sich die Michaelis-Konstante $K_m = 12,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

a NADH b



Tab. 9 und Abb. 8, Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alanin - Konzentration.

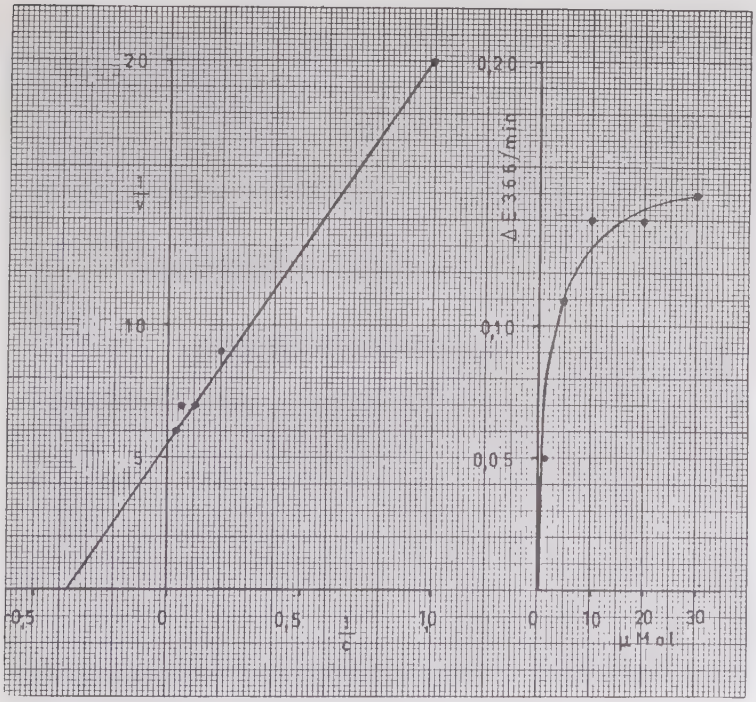
a) Ordinate : 1/v = 1/Extinktionsdifferenz x 100 pro min.
Abszisse : 1/c = 1/Mol Alanin pro Liter x 10^3

b) Ordinate : v Extinktionsdifferenz ΔE 366/min
Abszisse : c µMol Alanin/ml

Alanin µMol	Δ E 366/min	$\frac{1}{c}$	$\frac{1}{v}$
1	0,050	1,0	20
5	0,110	0,2	9
10	0,140	0,1	7
20	0,140	0,05	7
30	0,150	0,32	6

Es ergibt sich die Michaelis-Konstante $K_m = 2,6 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

a Alanin b



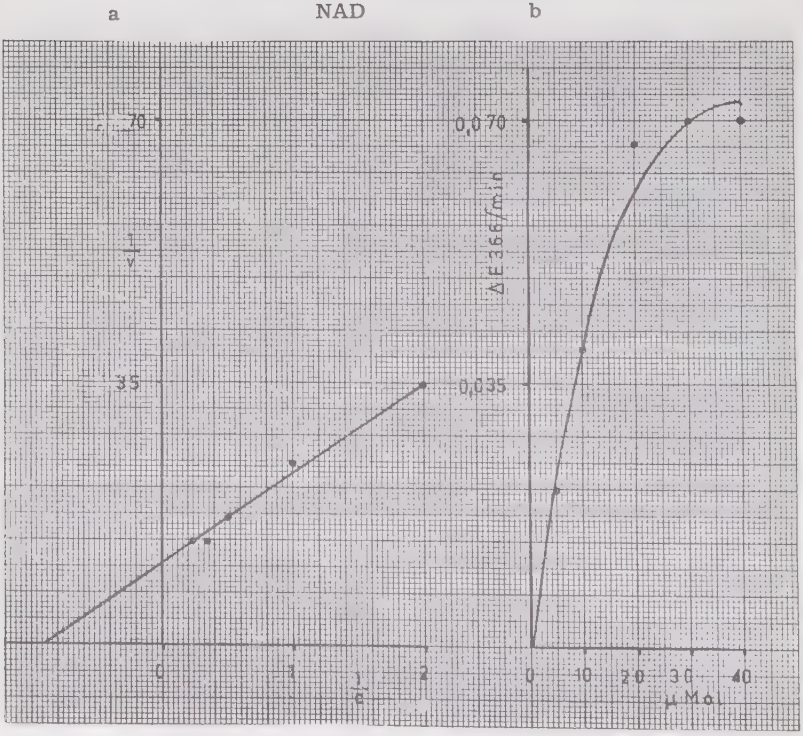
Tab. 10 und Abb. 9, Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NAD - Konzentration

a) Ordinate : 1/v = 1/Extinktionsdifferenz x 1000 pro min.
Abszisse: 1/c = 1/Mol NAD pro Liter x 10^3

b) Ordinate : v Extinktionsdifferenz ΔE 366/min
Abszisse : c µMol NAD / ml

NAD µMol	ΔE 366/min	$\frac{1}{c}$	$\frac{1}{v}$
5	0,028	2,00	35
10	0,040	1,00	25
20	0,060	0,50	17
30	0,070	0,33	14
40	0,070	0,25	14

Es ergibt sich die Michaelis-Konstante $K_m = 1,1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l



c. Kinetik der oxydativen Desaminierung von L-Alanin.

Aus Alanin wird Pyruvat durch die oxydative Desaminierung in stöchiometrischen Mengen gebildet, wie Tab 9 zeigt. Die NADH - Bildung wird bestimmt durch die Änderung der optischen Dichte bei 366 µm. Wir untersuchten die Rate der oxydativen Desaminierung von L-Alanin als eine Funktion der Konzentration von L-Alanin und von NAD.

Wie die Abb. 8 b und 9 b zeigen, erhält man die Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Konzentrationen von L-Alanin und von NAD, das Bild zeigt eine Hyperbel. Zur Auswertung der Sättigungskurven trugen wir nach Lineweaver und Burk (9) die reziproken Werte der Konzentrationen und der Geschwindigkeit in einem Koordinatensystem auf. Die Abb. 8 a und 9 a geben die Auswertung der Sättigungskurven nach Lineweaver und Burk (9) wieder, aus ihnen lassen sich die Michaeliskonstanten ermitteln.

d). Coenzym- und Substratspezifität

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde das Verhalten gegenüber NADH, NADPH, NAD und NADP geprüft. In mehreren Versuchen konnte keine Extinktionsabnahme von NADPH und auch keine Extinktionszunahme von NADPH festgestellt werden. Die α-Ketosäuren Oxalacetat und α-Ketoglutarat, sowie auch die Aminosäuren L - phenylalanin, L - Alanin und L - Serin waren keine Substrate für die Alanin-Dehydrogenase.

e. Aktivierung und Hemmung der Alanin-Dehydrogenase

Eine zusätzliche Besonderheit der Enzyme liegt in der biologischen Wirkung von Giften auf sie; denn man kann die deutlichen Effekte mancher Gifte in so niedrigen Konzentrationen nur als Hemmung der katalytischen Vorgänge verstehen.

Die Tab. 11 zeigt die Effekte der verschiedenen Hemmer auf den reduktiven Aminierungsversuch.

Die Notwendigkeit von SH-Gruppen für die Enzymaktivität ergibt sich wegen der extremen Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Parachlormercuribenzoat. Bestimmte Enzyme entfalten nur in Anwesenheit einer oder mehrerer spezifischer Sulfhydrylgruppen ihre Aktivität. Werden diese Gruppen von einem Quecksilber-Reagens wie Paracheormercuribenzoat oder von einem alkylierenden Reagens wie Jodacetamid blockiert, so geht die Enzymaktivität verloren. Diese Tatsache kann auch die Stimulation der Aktivität erklären, wenn man das Enzym mit EDTA behandelt, das die Metallionen zurückbewegt, welche die Oxydation der enzymgebundenen SH-Gruppen verursachen. Wird das Enzym in einem 0,02 M Triäthanolamin-Puffer bei p_H 7,5 verdünnt, verliert es schnell an Aktivität. Der Aktivitätsabfall kann durch Zugabe von Rinder-Albumin verhindert werden (1mg/ml). Die Hemmung manifestiert sich unabhängig davon, ob NADH oder Pyruvat vor dem Hemmer zugefügt werden.

Nach 10 Monaten wurde die Reaktion mit 10 µM Natriumpyruvat, 10 µ M NH_4Cl und 0,5 µM NADH gestartet und ergab folgende Werte:

Tab. 11	E 366/min. NADH
Kontrolle	0,090
EDTA	0,170
Cystein	0,190
Albumin	0,180
PCMA	0,200
Jodacetamid	0,600

Der Hemmeffekt des Parachloromercuribenzoates kann durch eine Behandlung des Enzyms mit Cystein auch ganz unterdrückt werden.

Die Ergebnisse, die Bulen bei der Glutamat-Dehydrogenase erhalten hat (10), sind denen ähnlich, die wir mit der Alanin-Dehydrogenase erzielten. Der schützende Effekt des Cysteins beruht entweder auf der Wirkung der α-Aminogruppe oder auf der reduzierenden Eigenschaft der Sulfhydrylgruppe (siehe Tab. 12).

Tab. 12

Hemmer	Konzentration µMol/ml	L-Cystein µMol	E 366 NADH
Kontrolle ohne Hemmer	-	-	0,180
PCMA	10^{-3}	-	0,035
PCMA	10^{-3}	0,3	0,160
PCMA	10^{-4}	-	0,060
PCMA	10^{-4}	0,3	0,155
PCMA	10^{-5}	-	0,100
PCMA	10^{-5}	0,3	0,165

f. p_H-Wert-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

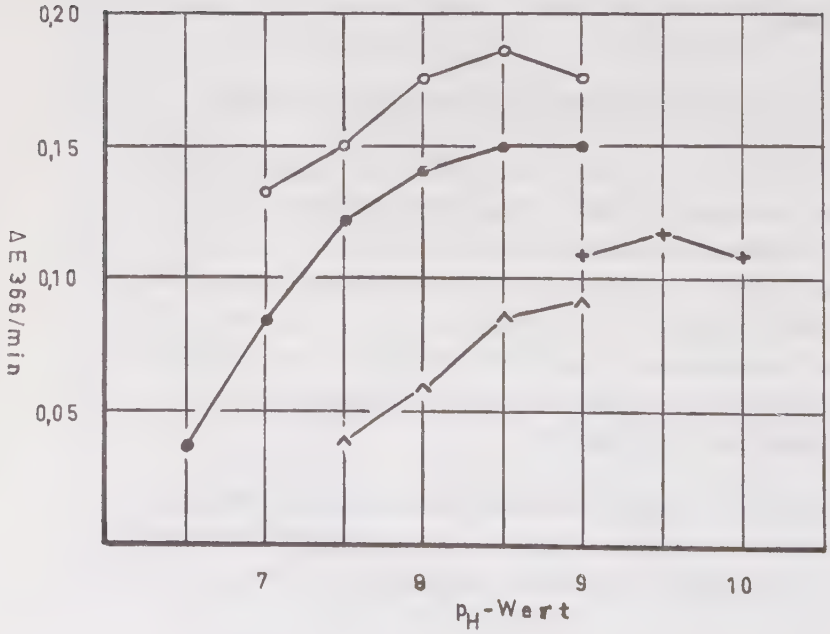
Proteine sind polyvalente, positiv und negativ geladene Ionen, und sie sind deshalb äußerst empfindlich gegenüber p_H-Verschiebungen; denn diese verändern nicht nur die Dissoziation bestimmter Restgruppen, welche vermutlich am katalytischen Prozeß beteiligt sind, sondern sie verursachen außerdem noch viel weitreichendere Strukturveränderungen im Proteinmolekül. Wegen dieser p_H-Abhängigkeit weisen Enzyme für ihre Aktivität sehr enge p_H-Optima auf.

Der p_H-Wert für das Aktivitätsmaximum der Alanindehydrogenase liegt im alkalischen Bereich, für die Aminierungsreaktion bei p_H 8,5 und für die Desaminierungs-Reaktion bei p_H 9,5

Die große Differenz zwischen den p_H-Optima der beiden Reaktionen beruht auf der Tatsache, daß das H^+-Ion als Reaktionspartner und die Konzentration der H-Ionen die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktionen beeinflussen.

Tab. 13 p_H-Wert-Abhängigkeit

Puffer p_H	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10,0
Aminierung								
Triäthanol-amin(0,05M)		0,130	0,150	0,175	0,180	0,175		
Tris(0,05M)	0,035	0,080	0,120	0,140	0,150	0,150		
Desaminierung								
Tris (0,05M)			0,040	0,060	0,080	0,090		
Diäthanolamin						0,110	0,120	0,110



D. Diskussion

Alanin dient der Euglena als Quelle für Kohlenstoff und Stickstoff. Der aktive Transport wird durch die Monojodessigsäure gehemmt, und dies dürfte in der Zerstörung des intrazellulären ATP begründet sein. Aus der Tatsache, daß der Influx von Alanin durch 2, 4-Dinitrophenol gehemmt wird, kann geschlossen werden, daß energiereiche Phosphate wahrscheinlich am aktiven Transport beteiligt sind. Bereits Christensen (7) diskutierte eine Möglichkeit, die Aminogruppe durch Pyridoxalphosphat zu aktivieren, und im Anschluß daran den Alanin-Influx zu beschleunigen. Gegen diese Annahme spricht unser Versuch mit Pyridoxalphosphat, der keinen Effekt auslöst. Eine Erklärung für den Einfluß der Sulfationen dürfte unter anderem in der Bindung der vielleicht erforderlichen zweiwertigen Ionen (wie Ca^{++} und Mg^{++}) zu suchen sein.

Es muß sich um einen allgemeinen Aminosäure-Mechanismus handeln: Das zeigt sich in der p_H-Abhängigkeit des Influx von Alanin, die mit der p_H-Abhängigkeit des Influx von Glutaminsäure (11) ziemlich übereinstimmt, obwohl die Dissoziationskonstanten der Glutaminsäure und des Alanins sehr verschieden sind. Da aber eine Übereinstimmung in der p_H-Abhängigkeit der beiden Influxe vorliegt, dürfte der Dissoziationszustand nicht direkt als Akzeptor für die Aminosäure fungieren. Eine Erklärung liefert vielleicht die p_H-Abhängigkeit des oberflächlichen ATPase-Systems.

Für den Eintritt des Alanins in den zellulären Stoffwechsel kommen zwei Wege in Betracht, auf denen der Kohlenstoff des Alanins eingeschleust werden kann. Diese beiden Möglichkeiten bieten die Alanin-Dehydrogenase und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase. Der Hauptweg jedoch scheint über die Alanin-Dehydrogenase zu gehen, trotz des ungünstigen Gleichgewichtes der oxydativen Desaminierung. Diese Schwierigkeit kann durch einen hohen NAD/NADH-Quotienten überwunden werden, weil die reduktive Aminierung gegenüber der oxydativen Desaminierung eine um den Faktor 10

höhere Aktivität aufweist. Bei der oxydativen Desaminierung entsteht Pyruvat, dieses kann den intermediären Stoffwechsel beeinflussen, indem es in den Citrat-Zyklus eingeschleust oder auch carboxyliert wird. In Hinblick auf die Polysaccharidsynthese erlangt das Pyruvat eine besondere Bedeutung, weil seine reduktive Carboxylierung zusammenwirkt mit der von Malat-Dehydrogenase katalysierten Oxydation des Malats zu Oxalacetat.

Durch die Transaminierungsreaktion und die Dehydrierung erlangt das Alanin Beziehung zu anderen Umwandlungsprodukten des Stoffwechsels. Wegen dieser engen Verknüpfung der Ketosäuren und Aminosäuren erzielt das Alanin eine Kontrolle über den Stickstoff-Stoffwechsel und die Zellatmung.

Die GPT und die Alanin-Dehydrogenase wirken nicht im Hauptweg des Citrat-Zyklus, sondern katalysieren eine auf der Stufe des Pyruvats abzweigende Nebenreaktion, die die Beziehung zum Alanin-Stoffwechsel herstellt.

Die Eiweißsynthese dürfte wahrscheinlich durch die NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenase bewirkt werden. Es ist zu vermuten, daß die spezielle physiologische Funktion dieser Glutamat-Dehydrogenase in der Bildung von Glutamat liegt, da das NADP-System vor allem als H-Donator zur Synthese dient.

Die aus der Oxydationsverarbeitung von Alanin erzielte Energie reicht auch im Dunkeln für eine positive Stoffbilanz aus.(11) Alanin dient nicht nur als Quelle für Kohlenstoff und Stickstoff, sondern auch für die Energie. Dies spricht ebenfalls dafür, daß die oxydative Desaminierung der Hauptweg der Alanin-Oxydation ist.

Das Enzym weist eine ausgeprägte Spezifität für NAD und NADH auf, NADP und NADPH werden mehr angegriffen.

Die Alanin-Dehydrogenase ist kein häufig vorkommendes Enzym. Bis jetzt wurde sie nur in Berichten von Wiame und Pierard (12)

erwähnt, die eine lösliche Alanin-Dehydrogenase aus Zellextrakten des Bactilus subtilus erhielten. Außerdem fand sie Goldmann (4) in Mycobacterium tuberculosis var. hominis.

E. Zusammenfassung

Der Transport des Alanins vom Kulturmedium ins Zellinnere wird durch Konzentrationsunterschiede charakterisiert.
Der Alanininflux ist p_H-abhängig und wird durch Dinitrophenol, Monojodessigsäure und Sulfationen gehemmt.
Ohne Einfluß ist Pyridoxalphosphat. In Extrakten aus Euglena gracilis wurde eine Aminosäure-Dehydrogenase nachgewiesen, die die reversible Übertragung der Aminogruppe von Alanin und Pyruvat katalysiert.

Die Alanin-Dehydrogenase wurde etwa 36 fach angereichert.

Die Michaelis-Konstanten der Alanin-Dehydrogenase mit den Reaktionspartnern Alanin, Aminoionen, NAD und NADH wurden angegeben.

Substrat- und Coenzym-Spezifität des Enzyms, und die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom p_H-Wert wurden untersucht.

Hemmung der Alanin-Dehydrogenasen-Aktivität durch Para-Chlormercuribenzoat und die Reversibilität durch Cystein wurden beschrieben.

Literaturverzeichnis

(1) WOLKEN, J.J. : in The Photochemical Apparatus; Its Structure und Function. Brookhaven Symp. Biol. Nr. 11, 87 (1959)

(2) WOLKEN, J.J. : Euglena. An Experimental organism for Biochemical and Biophysical Studies. The Rutgers University Press New Brunswick (1961), S. 34, 35, 138, 155.

(3) a. ADLER, E; EULER, H. von und Mitarbeiter in: f. physiol. Chem. 248 (1937) 227 u. 255 (1938) 27.

b. FINCHAM, J.R.S. in: J. Biol. Chem. 182 (1950) 61 u. J. Gen. Microbiol., 5 (1951) 793.

c. WIAME, J.M.; BOURGEOIS, S. u. COLLETTE, J. in: Arch. intern. physiol. et biochim., 63 (1959) 271.

d. HONG, M.M.; SHEN, S.C. u. BRAUNSTEIN, A.E. in: Biochim. Biophys. Acta, 36 (1959) 288

(4) GOLDMANN, D.S. in : Biochim. Biophys. Acta, 34 (1959) 527

(5) a. WEICHSELBAUM, T.E. in: Am. J. Pathol 10 (1940) 40

b. FRANCK, H. u. KOECHER, P.H. in: Deut. Arch. klin. Med. 197 (1950) 181

c. BUECHER, TH. u. Mitarbeiter in: 2. Naturforsch. 8 b (1953) 555.

(6) PFLEIDERER, G. in : Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 528 ff.

(7) CHRISTENSEN, H.N. u. JONES, J.C.: in: J. biol. Chem. 194, 57 (1962)

(8) BEISENHERZ, G.; BOLTZE, H.-J.; BÜCHER, Th.; CZOK, R.; GARBADE, K.W.; MEYER-ARENDT, E. u. PFLEIDERER, G. in: Z. Naturforsch. 86, 555 (1953)

(9) LINEWEAVER, H. u. BURK, D.: in: J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934).

(10) BULEN, W.A. :in: Arch. BiochemBiophys. 62 (1956) 173

(11) FRIEDRICH, G. : Die chlorophyllfreie und chlorophyllhaltige Euglena gracilis. Ein biochemischer Vergleich. Diss. 1968, Saarbrücken, vorgelegt.

(12) PIERARD, A. u. WIAME, J.M. in: Biochim. Biophys. Acta, 37 (1960) 49 ff.

Meinem sehr verehrten Lehrer
Prof. Dr. Dr. R. Ammon
danke ich für seine Ratschläge und
für seinen immer hilfsbereiten Beistand.

Lebenslauf.

Am 17. März 1934 wurde ich als Sohn des Hauptlehrers Jakob Friedrich und seiner Ehefrau Maria in Biel bei Trier geboren.
Vom sechsten bis zum zehnten Lebensjahr besuchte ich die Volksschule zu Wasserliesch. Im Sommer 1944 wurde ich in die Sexta des Hindenburg-Gymnasiums zu Trier aufgenommen. An dieser Schule legte ich am 18. Februar 1953 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1953 begann ich das Chemiestudium an der Universität Innsbruck. Nach dem Sommersemester 1955 wechselte ich die Universität und setzte mein Studium an der Universität zu Freiburg im Breisgau fort. Im Juni 1958 begann ich meine Diplomarbeit, die ich im Chemischen und Physiologisch-chemischen Institut ausführte. Am 28. VII. 1961 bestand ich die Diplomprüfung an der Universität Freiburg im Breisgau, Seit Wintersemester 1961/62 bin ich an der Universität des Saarlandes inscribiert. Dort legte ich am 16. August 1968 das medizinische Staatsexamen ab. Im Physiologisch-chemischen Institut arbeitete ich an meinen Dissertationen.
("Die Euglena gracilis - ein biochemischer Vergleich" und "Die Alanin-Dehydrogenase der Euglena gracilis. Bedeutung für den intermediären Stoffwechsel, Reinigung und Eigenschaften") zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen-mathematischen Fakultät und der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.